

This page Is Inserted by IFW Operations
And is not part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of
The original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
Please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

RECEIVED

NOV 20 2000

Docket No. 195870US0/hc

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

TECH CENTER 1600/2300

IN RE APPLICATION OF: Yoshinao KOJIMA, et al

SERIAL NO: 09/641,701

FILED: August 21, 2000

FOR: ALPHA 1, 4-GALACTOSYLTRANSFERASE AND DNA ENCODING THEREOF

GAU: 1632

EXAMINER:



#5
11-27-00
P.C.

REQUEST FOR PRIORITY

ASSISTANT COMMISSIONER FOR PATENTS
WASHINGTON, D.C. 20231

SIR:

- ☐ Full benefit of the filing date of U.S. Application Serial Number [US App No], filed [US App Dt], is claimed pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §120.
- ☐ Full benefit of the filing date of U.S. Provisional Application Serial Number , filed , is claimed pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §119(e).
- ☒ Applicants claim any right to priority from any earlier filed applications to which they may be entitled pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §119, as noted below.

In the matter of the above-identified application for patent, notice is hereby given that the applicants claim as priority:

<u>COUNTRY</u>	<u>APPLICATION NUMBER</u>	<u>MONTH/DAY/YEAR</u>
JAPAN	2000-035454	February 14, 2000

Certified copies of the corresponding Convention Application(s)

- ☒ are submitted herewith
- ☐ will be submitted prior to payment of the Final Fee
- ☐ were filed in prior application Serial No. filed
- ☐ were submitted to the International Bureau in PCT Application Number .
Receipt of the certified copies by the International Bureau in a timely manner under PCT Rule 17.1(a) has been acknowledged as evidenced by the attached PCT/IB/304.
- ☐ (A) Application Serial No.(s) were filed in prior application Serial No. filed ; and
(B) Application Serial No.(s)
 - ☐ are submitted herewith
 - ☐ will be submitted prior to payment of the Final Fee

Respectfully Submitted,

OBLON, SPIVAK, McCLELLAND,
MAIER & NEUSTADT, P.C.

Norman F. Oblon

Registration No. 24,618

Joseph A. Scafetta, Jr.
Registration No. 26,803



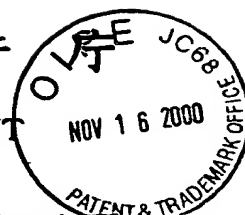
22850

Tel. (703) 413-3000
Fax. (703) 413-2220
(OSMMN 10/98)

09/641-391
RECEIVED

日 本 国 特 許

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT



NOV 16 2000

TECH CENTER 1600-2000

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日

Date of Application:

2000年 2月14日

出 願 番 号

Application Number:

特願2000-035454

出 願 人

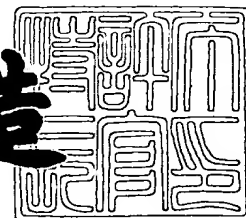
Applicant (s):

生化学工業株式会社
古川 鋼一

2000年10月 6日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

及川耕造



出証番号 出証特2000-3081748

【書類名】 特許願

【整理番号】 P-7040

【特記事項】 特許法第 3 0 条第 1 項の規定の適用を受けようとする特
許出願

【提出日】 平成12年 2月14日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N 15/00

【発明の名称】 α 1, 4 - ガラクトース転移酵素およびそれをコードす
る D N A

【請求項の数】 11

【発明者】

 【住所又は居所】 愛知県刈谷市高松町 3 - 7 3

 【氏名】 小島 啓尚

【発明者】

 【住所又は居所】 長崎県西彼杵郡長与町三根郷 5 3 - 1 3 1 - 5 - 5 2

 【氏名】 福本 敏

【発明者】

 【住所又は居所】 愛知県名古屋市北区名城 3 丁目 1 - 5 名城住宅 5 - 4
0 2

 【氏名】 古川 圭子

【発明者】

 【住所又は居所】 愛知県名古屋市守山区町南 1 4 - 2 5

 【氏名】 岡島 徹也

【発明者】

 【住所又は居所】 愛知県名古屋市北区名城 3 丁目 1 - 5 名城住宅 5 - 4
0 2

 【氏名】 古川 鋼一

【特許出願人】

 【識別番号】 000195524

【氏名又は名称】 生化学工業株式会社

【特許出願人】

【識別番号】 597130236

【氏名又は名称】 古川 鋼一

【代理人】

【識別番号】 100089244

【弁理士】

【氏名又は名称】 遠山 勉

【選任した代理人】

【識別番号】 100090516

【弁理士】

【氏名又は名称】 松倉 秀実

【選任した代理人】

【識別番号】 100100549

【弁理士】

【氏名又は名称】 川口 嘉之

【連絡先】 03-3669-6571

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 012092

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 α 1, 4 - ガラクトース転移酵素およびそれをコードする DNA

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 以下の (A) 又は (B) のポリペプチド。

(A) 配列番号 2 のアミノ酸番号 4 6 ~ 3 5 3 で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド。

(B) アミノ酸配列 (A) において、1 もしくは数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入または転位したアミノ酸配列からなり、かつガラクトース供与体から、受容体であるラクトシルセラミド又はガラクトシルセラミド中のガラクトース残基の C 4 位に、ガラクトース残基を転移する酵素活性を有するポリペプチド。

【請求項 2】 以下の (A') 又は (B') のポリペプチド。

(A') 配列番号 2 のアミノ酸番号 2 0 ~ 3 5 3 で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド。

(B') アミノ酸配列 (A') において、1 もしくは数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入または転位したアミノ酸配列からなり、かつガラクトース供与体から、受容体であるラクトシルセラミド又はガラクトシルセラミド中のガラクトース残基の C 4 位に、ガラクトース残基を転移する酵素活性を有するポリペプチド。

【請求項 3】 以下の (A'') 又は (B'') のポリペプチド。

(A'') 配列番号 2 のアミノ酸配列からなるポリペプチド。

(B'') アミノ酸配列 (A'') において、1 もしくは数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入または転位したアミノ酸配列からなり、かつガラクトース供与体から、受容体であるラクトシルセラミド又はガラクトシルセラミド中のガラクトース残基の C 4 位に、ガラクトース残基を転移する酵素活性を有するポリペプチド。

【請求項 4】 請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドをコードする DNA。

【請求項 5】 下記 (a) 又は (b) に示す DNA である請求項 4 記載の DNA。

(a) 配列番号 1 に記載の塩基配列のうち、塩基番号 2 6 9 ~ 1 1 9 2 からなる

塩基配列を含むDNA。

(b) 配列番号1に記載の塩基配列もしくは同塩基配列に相補的な塩基配列又はこれらの塩基配列の一部を有するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNA。

【請求項6】 ガラクトース供与体から、受容体であるラクトシルセラミド又はガラクトシルセラミド中のガラクトース残基のC4位に、ガラクトース残基を転移する酵素活性を有するポリペプチドをコードする請求項5記載のDNA。

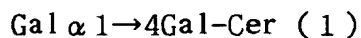
【請求項7】 請求項4～6のいずれか一項に記載のDNAを含有する組換えベクター。

【請求項8】 請求項4～6のいずれか一項に記載のDNA、又は請求項7記載の組換えベクターを宿主細胞に導入して得られる形質転換細胞。

【請求項9】 請求項8に記載の形質転換細胞を好適な培地で培養して請求項1～3のいずれか1項に記載のポリペプチドを発現させ、生成したポリペプチドを採取する工程を少なくとも含む、前記ポリペプチドの製造方法。

【請求項10】 請求項1～3のいずれか1項に記載のポリペプチド又は請求項8記載の形質転換細胞の培養物とラクトシルセラミドとを接触させ、酵素反応させる工程を少なくとも含む、Gb3/CD77の製造方法。

【請求項11】 請求項1～3のいずれか1項に記載のポリペプチド又は請求項7記載の形質転換細胞の培養物とガラクトシルセラミドとを接触させ、酵素反応させる工程を少なくとも含む、下記式(1)で示される糖脂質の製造方法。



(但し、Galはガラクトース残基を、Cerはセラミド残基を、 $\alpha 1 \rightarrow 4$ は $\alpha 1-4$ グリコシド結合を、それぞれ示す。)

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、組換えDNAを利用したポリペプチドの製造、又は診断もしくは治療に有用なツールに関する。詳しくは、本発明は $\alpha 1, 4$ -ガラクトース転移酵素及びそれをコードするDNA、当該DNAを含有する組換えベクター、当該D

NA又は組換えベクターで形質転換した形質転換細胞、及び、当該形質転換細胞を用いたGb3/CD77又はグロボ系糖脂質の製造方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

グリコスフィンゴ脂質は、両極性の分子であり（1；後述の文献番号を示す。以下同じ。）、糖転移酵素の連続した作用により合成される（2）。ラクトシルセラミド（以下、「LacCer」と称することがある）に、異なる3種の糖の内の一つが付加されると、3種の主要な糖脂質系、すなわち、ガングリオシド系（ $\alpha 2, 3$ -シアル酸）、ラクト／ネオラクト系（ $\beta 1, 4$ -N-アセチルグルコサミン）、およびグロボ系（ $\alpha 1, 4$ -ガラクトース）のいずれか1種となる。グリコスフィンゴ脂質の炭水化物部分の合成に関与する酵素をコードする多くの遺伝子が今までに単離されているが（3）、グロボ系糖脂質の合成に特異的な糖転移酵素は、未だ単離されていない。

【0003】

グロボ系糖脂質であるグロボトリアオシルセラミド（以下、「Gb3」と称することがある）は、赤血球におけるP式血液型の P^K 抗原として特徴付けられる（5）。Wielsらによって報告されているように、Gb3はバーキットリンパ腫関連抗原であり（6）、Gb3の発現および生物学的重要性について研究されている（7, 8, 9）。Gb3はCD77に分類されることから（10）、この抗原をGb3/CD77と称することとする。

【0004】

Gb3/CD77は、バーキットリンパ腫細胞において、多量発現していることが報告されている。しかしながら、Gb3/CD77は、現在ではB細胞上に発現する分化抗原と考えられており、B細胞系統の幾つかの悪性腫瘍においても観察され得る（7）。通常の白血球では、Gb3/CD77は胚中心の扁桃B細胞のサブセットにおいて発現する（9）。興味深いことに、分離してインビトロで培養した場合、Gb3/CD77を産生するBリンパ細胞は、急速にして自発的なアポトーシスを受ける（11）。さらに、Gb3/CD77抗原を持つバーキットリンパ腫細胞もまた、低血清濃度の培地、あるいは抗-イムノグロブリンM抗体による架橋により、アポトーシスが容易

に誘導される (12)。

【0005】

また、Gb3/CD77は、重い細胞毒作用を引き起こす可能性がある (13,14) エシエリヒア・コリ (E. coli) 0157由来のシガ (Shiga) 様毒素であるペロ毒素 (VTs) に対するレセプターとして認識されてきている。ペロ毒素のB-サブユニットはGb3/CD77に特異的に結合し、そしてA-サブユニットが細胞に取り込まれ、その結果、28SリボソームRNAが分解され、細胞は死滅する (15)。また、B-サブユニットのみでもアポトーシスを引き起し得る (16)。これらの結果から、Gb3/CD77はアポトーシスシグナルの媒介において重要な分子であることが示されるが、正確なメカニズムについては研究の余地がある。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

前述のとおり、グロボ系糖脂質であるGb3/CD77は、LacCerに α 1,4-ガラクトースが付加されることにより生成することが判明しているが (4)、この反応に特異的な糖転移酵素は単離されていない。本発明は、前記反応を触媒するGb3/CD77合成酵素、すなわち α 1,4-ガラクトース転移酵素、及び同酵素をコードするDNAを単離し、さらにそれらの利用法を提供することを課題とする。

【0007】

【課題を解決するための手段】

本発明者等は、上記課題を解決するために鋭意検討を重ねた結果、 α 1,4-ガラクトース転移酵素をコードするDNAを単離してその塩基配列を明らかにし、さらにこのDNAが、活性を有する α 1,4-ガラクトース転移酵素を発現することを確認して、本発明を完成した。

【0008】

すなわち本発明は、以下の (A) 又は (B) のポリペプチド (以下、「本発明ポリペプチド」ともいう) である。

(A) 配列番号2のアミノ酸番号46～353で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド。

(B) アミノ酸配列 (A) において、1もしくは数個のアミノ酸が置換、欠失、

挿入または転位したアミノ酸配列からなり、かつガラクトース供与体から、受容体であるラクトシルセラミド又はガラクトシルセラミド中のガラクトース残基の C 4 位に、ガラクトース残基を転移する酵素活性を有するポリペプチド。

【0009】

本発明ポリペプチドの他の態様は、以下の (A') 又は (B') のポリペプチドである。

(A') 配列番号 2 のアミノ酸番号 20～353 で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド。

(B') アミノ酸配列 (A') において、1 もしくは数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入または転位したアミノ酸配列からなり、かつガラクトース供与体から、受容体であるラクトシルセラミド又はガラクトシルセラミド中のガラクトース残基の C 4 位に、ガラクトース残基を転移する酵素活性を有するポリペプチド。

【0010】

また本発明ポリペプチドの別の態様は、以下の (A'') 又は (B'') のポリペプチドである。

(A'') 配列番号 2 のアミノ酸配列からなるポリペプチド。

(B'') アミノ酸配列 (A'') において、1 もしくは数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入または転位したアミノ酸配列からなり、かつガラクトース供与体から、受容体であるラクトシルセラミド又はガラクトシルセラミド中のガラクトース残基の C 4 位に、ガラクトース残基を転移する酵素活性を有するポリペプチド。

【0011】

本発明はまた、前記のいずれかのポリペプチドをコードする DNA (以下、「本発明 DNA」ともいう) を提供する。同 DNA として具体的には、下記 (a) 又は (b) に示す DNA が挙げられる。

(a) 配列番号 1 に記載の塩基配列のうち、塩基番号 269～1192 からなる塩基配列を含む DNA。

(b) 配列番号 1 に記載の塩基配列もしくは同塩基配列に相補的な塩基配列又はこれらの塩基配列の一部を有する DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする DNA。

本発明はまた、前記DNAにおいて、ガラクトース供与体から、受容体であるラクトシルセラミド又はガラクトシルセラミド中のガラクトース残基のC4位に、ガラクトース残基を転移する酵素活性を有するポリペプチドをコードするDNAを提供する。

【0012】

本発明はさらに、前記DNAを含有する組換えベクターを提供する。

また本発明は、前記DNA又は前記組換えベクターを宿主細胞に導入して得られる形質転換細胞を提供する。

【0013】

さらに本発明は、前記形質転換細胞を好適な培地で培養して、前記のいずれかのポリペプチドを発現させ、生成したポリペプチドを採取する工程を少なくとも含む、前記ポリペプチドの製造方法を提供する。

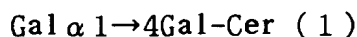
【0014】

本発明はまた、前記のいずれかのポリペプチド又は前記形質転換細胞の培養物とラクトシルセラミドとを接触させ、酵素反応させる工程を少なくとも含む、Gb3/CD77の製造方法を提供する。

【0015】

本発明はさらに、前記のいずれかのポリペプチド又は前記形質転換細胞の培養物とガラクトシルセラミドとを接触させ、酵素反応させる工程を少なくとも含む、下記式(1)で示される糖脂質の製造方法を提供する。

【0016】



(但し、Galはガラクトース残基を、Cerはセラミド残基を、 $\alpha 1\rightarrow 4$ は $\alpha 1$ -4グリコシド結合を、それぞれ示す。以下同じ。)

【0017】

本発明において、ガラクトース供与体から、受容体であるラクトシルセラミド又はガラクトシルセラミド中のガラクトース残基のC4位に、ガラクトース残基を転移する反応を触媒する酵素を、「 $\alpha 1$, 4-ガラクトース転移酵素」という。また、ガラクトース供与体から、受容体であるラクトシルセラミド又はガラク

トシルセラミド中のガラクトース残基のC4位に、ガラクトース残基を転移する反応を触媒する酵素活性を、「 $\alpha 1, 4$ -ガラクトース転移酵素活性」という。

【0018】

【発明の実施の形態】

以下、本発明を詳細に説明する。

【0019】

<1>本発明ポリペプチド

本発明ポリペプチドは、以下の(A)又は(B)のポリペプチドである。

(A) 配列番号2のアミノ酸番号46~353で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド。

(B) アミノ酸配列(A)において、1もしくは数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入または転位したアミノ酸配列からなり、かつガラクトース供与体から、受容体であるラクトシルセラミド又はガラクトシルセラミド中のガラクトース残基のC4位に、ガラクトース残基を転移する酵素活性を有するポリペプチド。

【0020】

上記ポリペプチドは、後述するように、 $\alpha 1, 4$ -ガラクトース転移酵素の触媒ドメインを少なくとも含むポリペプチドである。 $\alpha 1, 4$ -ガラクトース転移酵素は、N末端から順に細胞質ドメイン、膜貫通ドメイン及び触媒ドメインを有している。前記(A')又は(B')で示されるポリペプチドは、少なくとも膜貫通ドメイン及び触媒ドメインを含むポリペプチドである。また、前記(A'')又は(B'')で示されるポリペプチドは、細胞質ドメイン、膜貫通ドメイン及び触媒ドメインを含むポリペプチドである。これらのポリペプチドはいずれも、本発明ポリペプチドに含まれる。

【0021】

本発明ポリペプチドのアミノ酸配列の一例を、配列番号2に示す。配列番号2において、アミノ酸番号1~19が細胞質ドメイン、アミノ酸番号20~45が膜貫通ドメイン、アミノ酸番号46~353が触媒ドメインである。

【0022】

上記ポリペプチドの中でも、(A)、(A')及び(A'')のポリペプチドが

好ましく、(A') 及び (A'') がより好ましく、(A'') が特に好ましい。しかし、 $\alpha 1, 4$ -ガラクトース転移酵素活性を有する限り、いずれのポリペプチドであってもよい。

【0023】

なお本明細書中において、「1 もしくは数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入または転位したアミノ酸配列からなり、かつガラクトース供与体から、受容体であるラクトシルセラミド又はガラクトシルセラミド中のガラクトース残基の C 4 位に、ガラクトース残基を転移する酵素活性を有するポリペプチド」とは、ガラクトース供与体から、受容体であるラクトシルセラミド又はガラクトシルセラミド中のガラクトース残基の C 4 位に、ガラクトース残基を転移する活性 ($\alpha 1, 4$ -ガラクトース転移酵素活性) を実質的に害さない 1 もしくは数個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入又は転位を有していてもよいことを示す。

【0024】

すなわち、天然に存在するポリペプチドには、それをコードする DNA の多形や変異の他、生成後のポリペプチドの細胞内および精製中の修飾反応などによってそのアミノ酸配列中にアミノ酸の置換、欠失、挿入又は転位等の変異が起こりうるが、それにもかかわらず変異を有しないポリペプチドと実質的に同等の生理、生物学的活性を示すものがあることが知られている。このように構造的に若干の差違があってもその機能については大きな違いが認められないものも、本発明ポリペプチドに包含される。人為的にポリペプチドのアミノ酸配列に上記のような変異を導入した場合も同様であり、この場合にはさらに多種多様の変異体を作製することが可能である。例えば、ヒトインターロイキン 2 (IL-2) のアミノ酸配列中の、あるシステイン残基をセリンに置換したポリペプチドがインターロイキン 2 活性を保持することが知られている (Science, 224, 1431 (1984))。また、ある種のポリペプチドは、活性には必須でないペプチド領域を有していることが知られている。例えば、細胞外に分泌されるポリペプチドに存在するシグナルペプチドや、プロテアーゼの前駆体等に見られるプロ配列などがこれにあたり、これらの領域のほとんどは翻訳後、または活性型ポリペプチドへの転換に際して除去される。このようなポリペプチドは、一次構造上は異なった形で存在しているが

、最終的には同等の機能を有するポリペプチドであり、本発明ポリペプチドに含まれるものである。

【 0 0 2 5 】

なお本明細書における「数個のアミノ酸」とは、本発明酵素の活性が失われない程度の変異を起こしてもよいアミノ酸の数を示し、例えば400アミノ酸残基からなるポリペプチドの場合、2～20程度、好ましくは2～10、より好ましくは2～5以下の数を示す。

【 0 0 2 6 】

α 1, 4-ガラクトース転移酵素活性は、公知の方法(4)によって測定できる。具体的には、後記実施例に示すように、UDP-ガラクトース(UDP-Gal)を供与体として用い、LacCerへのガラクトースの転移反応を利用した測定方法を用いることによって測定できる。よって当業者であれば、 α 1, 4-ガラクトース転移酵素活性の有無を指標として、該活性を実質的に害さない1つ以上のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入又は転位を容易に選択することができる。

【 0 0 2 7 】

本発明ポリペプチドは、ヒトメラノーマ細胞株からの α 1, 4-ガラクトース転移酵素cDNAの単離、及び同cDNAのマウスの線維芽細胞における発現により、同定され、性質及び構造が明らかとなったものである。本発明ポリペプチドは、後述の本発明DNAを適当な細胞で発現させることにより、取得することができる。また、化学合成等により製造されたポリペプチドも、当然に本発明ポリペプチドに含まれる。本発明DNAを用いた本発明ポリペプチドの製造方法については後述する。

【 0 0 2 8 】

なお本発明ポリペプチドは、必ずしも単独のポリペプチドでなくてもよく、必要により融合タンパク質の一部となってもよい。例えば、本発明ポリペプチドのポリペプチドと他のポリペプチド、例えばプロテインA、を含む融合ポリペプチドが例示される。

【 0 0 2 9 】

本発明ポリペプチドは、ガラクトース供与体から、受容体であるラクトシルセ

ラミド又はガラクトシルセラミド中のガラクトース残基の C 4 位に、ガラクトース残基を転移する酵素活性を有する限り、ポリペプチドのみからなるものであってもよいし、糖鎖等を有していてもよい。

【 0 0 3 0 】

< 2 > 本発明 DNA

本発明 DNA は、前記の本発明ポリペプチドをコードする DNA である。
同 DNA として具体的には、下記 (A) 又は (B) のポリペプチドをコードする DNA が挙げられる。

(A) 配列番号 2 のアミノ酸番号 4 6 ~ 3 5 3 で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド。

(B) アミノ酸配列 (A) において、1 もしくは数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入または転位したアミノ酸配列からなり、かつガラクトース供与体から、受容体であるラクトシルセラミド又はガラクトシルセラミド中のガラクトース残基の C 4 位に、ガラクトース残基を転移する酵素活性を有するポリペプチド。

【 0 0 3 1 】

この中でも、(A) のポリペプチドをコードする DNA が好ましい。

上記 DNA は、少なくとも α 1, 4 - ガラクトース転移酵素の触媒ドメインを含むポリペプチドをコードする DNA であるが、本発明 DNA は、加えて膜貫通ドメインを含むポリペプチド、又は、さらに細胞質ドメインを含むポリペプチドをコードする DNA も含む。

【 0 0 3 2 】

上記 (A) のポリペプチドをコードする DNA として具体的には、例えば配列番号 1 において塩基番号 2 6 9 ~ 1 1 9 2 で表される塩基配列を含む DNA が例示される。また、膜貫通ドメインを含むポリペプチドをコードする DNA として具体的には、例えば配列番号 1 において塩基番号 1 9 1 ~ 1 1 9 2 で表される塩基配列を含む DNA が例示される。さらに、細胞質ドメインを含むポリペプチドをコードする DNA として具体的には、例えば配列番号 1 において塩基番号 1 3 4 ~ 1 1 9 2 で表される塩基配列を含む DNA が例示される。

【 0 0 3 3 】

なお、配列番号 1 の塩基配列を有する DNA は、もともとはヒト由来のものであるが、本発明 DNA の由来は限定されず、遺伝子工学的手法や化学合成等により製造された DNA も当然に包含される。

【 0 0 3 4 】

なお、遺伝暗号の縮重による異なった塩基配列を有する DNA も本発明 DNA に包含されることは、当業者であれば容易に理解されるところである。

また、本発明 DNA には、本発明 DNA に相補的な DNA 又は RNA も包含される。さらに本発明 DNA は、本発明ポリペプチドをコードするコード鎖のみの一本鎖であってもよく、この一本鎖およびこれと相補的な塩基配列を有する DNA 鎖または RNA 鎖からなる二本鎖であってもよい。

【 0 0 3 5 】

本発明 DNA は、後述する発現クローニング法によって得られたものであるが、本発明 DNA の塩基配列が明らかになったので、同塩基配列に基づいて作製したオリゴヌクレオチドをプライマーとする PCR によってヒト由来 mRNA もしくは cDNA ライブラリー、または染色体 DNA から、あるいは前記塩基配列にもとづいて作製したオリゴヌクレオチドプローブを用いたハイブリダイゼーションにより cDNA ライブラリーまたは染色体 DNA ライブラリーから、単離することもできる。

【 0 0 3 6 】

尚、染色体 DNA から本発明 DNA を得た場合には、イントロンを含むことが予想されるが、そのようなイントロンを含む DNA であっても、本発明 DNA に包含される。

【 0 0 3 7 】

本発明 DNA は、ガラクトース供与体から、受容体であるラクトシルセラミド又はガラクトシルセラミド中のガラクトース残基の C 4 位に、ガラクトース残基を転移する酵素活性を有するポリペプチドをコードする限り、配列番号 1 の塩基配列、又は配列番号 1 において塩基番号 2 6 9 ~ 1 2 9 2 からなる塩基配列、塩基番号 1 9 1 ~ 1 2 9 2 からなる塩基配列、もしくは塩基番号 1 3 4 ~ 1 2 9 2 からなる塩基配列に相補的な塩基配列又は該塩基配列の一部を有するプローブと

、ストリンジントな条件下でハイブリダイズするDNAであってもよい。ここでいう「ストリンジントな条件」とは、いわゆる特異的なハイブリッドが形成され、非特異的なハイブリッドが形成されない条件をいう (Sambrook, J. et al., Molecular Cloning A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)等参照)。「ストリンジントな条件」として具体的には、50%ホルムアミド、 $4 \times \text{SSC}$ 、50mM HEPES (pH7.0)、 $10 \times \text{Denhardt's solution}$ 、 $100 \mu\text{g/ml}$ サケ精子DNAを含む溶液中、 42°C でハイブリダイズさせ、次いで室温で $2 \times \text{SSC}$ 、0.1% SDS 溶液、 50°C 下で $0.1 \times \text{SSC}$ 、0.1% SDS 溶液で洗浄する条件が挙げられる。

【0038】

本発明DNAを導入した形質転換細胞を好適な培地で培養して、本発明DNAがコードする本発明ポリペプチドを発現させ、生成したポリペプチドを採取することにより、本発明ポリペプチドを製造することができる。生成した本発明ポリペプチドは、形質転換細胞の培養物（形質転換細胞と培地を含むもの）から採取できるが、本発明ポリペプチドが形質転換細胞の細胞質中又は膜面分に生成、蓄積する場合は形質転換細胞から、また、培地中に蓄積する場合は、培地から、採取する。さらに、本発明ポリペプチドが発現した細胞を利用する場合は、形質転換細胞又はその処理物をそのまま、又は適当な固相に結合し、もしくはゲルに包括させ、固定化して、利用することができる。すなわち、「形質転換細胞」の用語には、形質転換細胞そのもののみならず、その抽出物も含まれる。

【0039】

本発明DNAを宿主細胞に導入するには、例えば、本発明DNAを適当なベクターに組み込んで組換えベクターを作製し、この組換えベクターを用いて本発明DNAを宿主細胞に導入すればよい。ベクターとしては、発現ベクターが好ましい。

【0040】

宿主細胞は、本発明DNA又は本発明DNAを組み込んだ組換えベクターの機能を発揮できる限りにおいて特に限定されず、動物細胞、植物細胞、微生物細胞（菌体）が包含され、エシェリヒア・コリ等の原核細胞や、哺乳類細胞等の真核

細胞が具体的に例示される。エシェリヒア・コリなどの原核細胞を用いた際は、本発明DNAの発現によって生じるポリペプチドに糖鎖の付加が起こらないため、糖鎖が付加されていない本発明ポリペプチドを得ることが可能であり、また、哺乳類細胞等の真核細胞を用いた場合は、本発明DNAの発現によって生じるポリペプチドに糖鎖が付加しうるため、糖鎖を含むポリペプチドの形態で得ることも可能である。

【 0 0 4 1 】

本発明DNAを導入する宿主細胞としてより具体的には、例えばマウスの線維芽細胞であるL細胞が挙げられる。また、ベクターとして具体的には、pCDM8、p cDNA3発現ベクター（いずれもインビトロジェン(Invitrogen)社）等が挙げられる。培地や培養条件は、用いる宿主すなわち細胞に合わせて適宜選択される。

【 0 0 4 2 】

本発明DNAは、直接発現させてもよいし、他のポリペプチドとの融合ポリペプチドとして発現させてもよい。また、本発明DNAは全長を発現させてもよいし、一部を部分ペプチドとして発現させてもよい。

【 0 0 4 3 】

本発明DNAを宿主細胞に導入する方法としては、例えば、DEAE-デキストラン法（DEAE-dextran method）（18）を用いてトランスフェクションを行う方法がある。

【 0 0 4 4 】

培養物からの本発明ポリペプチドの採取は、公知のポリペプチドの抽出、精製方法によって行うことができる。なお培養物には、培地および当該培地中で培養された細胞が包含される。

【 0 0 4 5 】

本発明ポリペプチドの抽出方法として具体的には、窒素キャビテーション装置を用いる方法、ホモジナイズ、ガラスビーズミル法、音波処理、浸透ショック法、凍結融解法等の細胞破碎による抽出、界面活性剤抽出、またはこれらの組み合わせ等の処理操作が挙げられる。

【 0 0 4 6 】

本発明DNAとして、前記(A'')のポリペプチドをコードするDNAをL細胞で発現させると、本発明ポリペプチドは細胞の膜画分に局在する。また、本発明DNAを、本発明ポリペプチド又は一部を欠く本発明ポリペプチドと他のポリペプチドとの融合タンパク質として、可溶性の形態で発現させると、同融合タンパク質は細胞質中に局在し得る。また、本発明DNAを、本発明ポリペプチド又は一部を欠く本発明ポリペプチドと分泌シグナルとの融合タンパク質として発現させると、培地中に分泌し得る。尚、一部を欠く本発明ポリペプチドをコードするDNAは、そのように設計されたプライマーを用いてPCRを行うことにより、ヒト由来mRNAもしくはcDNAライブラリー、または染色体DNAから単離することができる。

【0047】

細胞又は培地から抽出される本発明ポリペプチドの精製方法として具体的には、例えば硫酸アンモニウム(硫安)や硫酸ナトリウム等による塩析、遠心分離、透析、限外濾過法、吸着クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、ゲルろ過法、ゲル浸透クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、電気泳動法等や、これらの組み合わせ等の処理操作が挙げられる。

【0048】

精製されたポリペプチドのアミノ酸配列、作用、基質特異性等を分析することによって、本発明ポリペプチドの製造が確認できる。

【0049】

<3>本発明ポリペプチド及び本発明DNAの利用

本発明ポリペプチドは、グロボ系糖脂質の合成に利用することができる。例えば、本発明ポリペプチド又は本発明DNAが導入された形質転換細胞の培養物と、ラクトシルセラミドとを接触させ、酵素反応させることにより、Gb3/CD77を製造することができる。また、本発明ポリペプチド又は本発明DNAが導入された形質転換細胞の培養物とガラクトシルセラミドとを接触させ、酵素反応させることにより、下記式(1)で示される糖脂質を製造することができる。

【0050】

Gal α 1 \rightarrow 4Gal-Cer (1)

ここで、本発明ポリペプチドが形質転換細胞の細胞質中又は膜画分に生成、蓄積する場合は形質転換細胞を、培地中に蓄積する場合は培地を接触させればよい。また、本発明ポリペプチドが発現した細胞を利用する場合は、形質転換細胞又はその抽出物をそのまま、又は固定化したものを接触させてもよい。「形質転換細胞」の用語には、形質転換細胞そのもののみならず、その抽出物も含まれる。

【0051】

また、本発明ポリペプチドは、糖タンパク質中の糖鎖に含まれるラクトシルセラミド又はガラクトシルセラミド中のガラクトース残基のC4位に、特異的にガラクトース残基を付加することができる。さらに、本発明ポリペプチドは、糖鎖の選択的合成に利用することができる。

【0052】

現在まで、多くの β 1,3-ガラクトース転移酵素及び β 1,4-ガラクトース転移酵素が同定されているが(27~30)、本発明の α 1,4-ガラクトース転移酵素をコードする遺伝子は、今までに単離された最初にして唯一の α 1,4-ガラクトース転移酵素遺伝子である。また、線虫(*C. elegans*)またはショウジョウバエ(*Drosophila melanogaster*)の遺伝子のデータベースにおいて、多くの β 1,3-ガラクトース転移酵素及び β 1,4-ガラクトース転移酵素関連遺伝子が同定されているのにも関わらず、 α 1,4-ガラクトース転移酵素遺伝子は検出されていない。これらの事実から、 α 1,4-ガラクトース転移酵素は、他のガラクトシル転移酵素よりも比較的遅れて進化したこと、また、Gb3を通して合成されたグロボ系糖脂質は、他の系の糖脂質と比較して、より精密な役割を果たしていることを示唆している可能性がある。

【0053】

また、Gb3/CD77は、通常のレセプターとは異なるようである。なぜなら、細胞質ドメインを有していなくても、正常な細胞および悪性腫瘍細胞両方において、様々なアポトーシスシグナルを媒介することができるからである(16, 31)。インビトロにおいて観察される、CD77⁺ BC B細胞の急速な死滅は、内因性のリガンド分子がGb3/CD77と相互作用して、未成熟B細胞の生理的選択をもたらすことを

示唆する (11, 32)。さらに、CD77⁺細胞のアポトーシスを引き起こすペロ毒素のBサブユニットは、Gb3/CD77関連細胞質分子の研究を強く推進させる (16)。これらのリガンドおよびGb3/CD77に関連するシグナルトランスデューサーは、B細胞の選択、およびエシェリヒア・コリ0157感染によって引き起こされる溶血性尿毒症症候群の発症についての更なる理解に貢献するであろう。特に、腎不全、溶血および神経学的症状など、本症候群の組織特異性が、本発明のGb3/CD77合成酵素である α 1,4-ガラクトース転移酵素の遺伝子操作により、明かにされることが期待される。

【0054】

さらに、Gb3/CD77およびガングリオシドGM3は、HIV-1表面糖タンパク質gp120とグリコスフィンゴ脂質ミクロドメインとの間のCD4誘導相互作用における、1型ヒト免疫不全ウイルス (HIV-1) の侵入に対する選択的補助因子として機能する可能性があることが、最近報告されている (33, 34)。もし、そのとおりであれば、Gb3/CD77は、バクテリア性毒素のみならずウイルスに対するレセプターである可能性があり、また、Gb3/CD77発現調節は、HIV-1に対するウイルス感染の治療方法における、鍵となるターゲットとなる可能性もある。

【0055】

また、腎臓におけるGb3/CD77の発現は、溶血性尿毒症症候群 (HUS) の発症に関与していると考えられている。さらに、ファブリー病は、腎臓、心臓、脳及び血管等にGb3/CD77が蓄積する疾患であることが知られている。以上のことから、本発明ポリペプチド及び本発明DNA、ならびに本発明のGb3/CD77又は糖脂質の製造方法は、このようなGb3/CD77の異常発現による疾患の治療用ツール、診断用ツール、あるいは研究手段として利用され得る。

【0056】

【実施例】

以下に、本発明を実施例によりさらに具体的に説明する。

【0057】

【実施例1】 α 1,4-ガラクトース転移酵素 (α 1,4Gal-T) cDNAの単離
<1>ヒトメラノーマ細胞株のcDNAライブラリーの調製及び α 1,4Gal-T cDNAの

クローニング

ヒトメラノーマ細胞株 (SK-MEL-37) から、公知の方法 (17) により、ポリ (A⁺) RNA を調製し、cDNA を合成した。これをベクタープラスミド pCDM8 (インビトロジェン社) に挿入することにより cDNA ライブラリーを構築した。この cDNA ライブラリーは、 5×10^6 個の独立したコロニーを含んでいる。ライブラリーの構築には、エシェリヒア・コリ (E. coli) MC1061/P3 株 (18) を用いた。前記 SK-MEL-37 株は Gb3/CD77 の表面発現を欠いており、 $\alpha 1,4\text{Gal-T}$ を非常に高く発現することから、この細胞株から作製された cDNA ライブラリーは、良好な cDNA ライブラリーとなる。

【 0 0 5 8 】

上記の cDNA ライブラリーのプラスミドを、DEAE-デキストラン法 (18) によって、pdl3027 (ポリオーマ T 遺伝子を含む。ニューヨーク大学の C. Basilico 博士の好意により提供された) と共に L 細胞に導入した。L 細胞は $\alpha 1,4\text{Gal-T}$ 活性を有しておらず、また、Gb3/CD77 も発現しないが、大量の LacCer を発現する (19)。L 細胞のこれらの特徴により、 $\alpha 1,4\text{Gal-T}$ cDNA クローニングにおける、良好な宿主導入細胞となり得る。前記 L 細胞は、マウス線維芽細胞であり、スローン-ケタリング (Sloan-Kettering) 癌センターの A. P. アルビノ (Albino) 博士により恵与された。同細胞は 7.5% ウシ胎仔血清 (FCS) を含むダルベッコ改変イーグル最少培地 (DMEM) にて培養した。

【 0 0 5 9 】

DNA の導入の 48 時間後、導入された細胞を分離し、抗 Gb3/CD77 抗体である、ラットモノクローナル抗体 (mAb) 38.13 (6) と共に、氷冷下で 45 分間インキュベートした。細胞を洗浄後、文献 (17) に記載されるように、ウサギ抗ラット IgM (ザイメド (ZYMED) 社) でコートされたディッシュに固定した。選別された細胞から Hirt エキス調製により、プラスミド DNA を回収した。この DNA で E. coli MC1061/P3 を形質転換した。形質転換株からプラスミド DNA を回収した。以上の操作を、5 回繰り返し行った。最終的に得られた形質転換株からプラスミドを回収し、L 細胞のマイクロスケールのトランスフェクション、及び導入株における Gb3/CD77 の細胞表面発現を、文献 (19) に記載されているように、フ

ローサイトメトリー（ベクトンディッキンソン社）により分析した。その際、一次抗体としてmAbs38.13又はTU-1（23）を、二次抗体としてFITC-結合ウサギ抗ラットIgG又は抗マウスIgM（ザイメド社）を用いた。その結果、陽性反応を示す2個のクローンを単離することができた。後述の通り、この2個のクローンは本質的に同一であることから、そのうちの1つをpVTR1と命名し、分析を続けることとした。

【0060】

図1に、プラスミドpVTR1、およびコントロールとして、インサートが挿入されていないプラスミドpCDM8を、上述した方法で導入したL細胞のフローサイトメトリーの結果を示す。pVTR1が導入された細胞は明らかにGb3/CD77を発現しているが、pCDM8のみが導入されたL細胞は発現していないことが明かである。こうして、pVTR1に挿入されている $\alpha 1,4\text{Gal-T}$ は、Gb3/CD77の合成に関与していることが明かにされた。

【0061】

<2>導入細胞からの糖脂質の抽出およびGb3/CD77の同定

上述した導入細胞から、文献（21）に記載されるようにして糖脂質を抽出した。すなわち、導入細胞から、クロロホルム/メタノールを、2:1、1:1、1:2の順に用いて、約400 μ lの密集した細胞（packed cells）から、糖脂質を抽出した。

【0062】

この抽出した糖脂質について、高性能TLCプレート（メルク（MERK）社、Darmstadt）、及び、溶媒としてクロロホルム：メタノール：0.22% CaCl_2 （60:35:8）を用いて、薄層クロマトグラフィー（TLC）を行った。バンドの検出は、オルシノール噴霧によって行った。基準として、ウシ脳ガングリオシド混合物（和光純薬工業（株）、東京）、ヒト赤血球由来中性糖脂質、Gb3（シグマ社）を用いた。

【0063】

その結果、導入細胞から抽出されたグリコスフィンゴ脂質は、TLCにおいて明確なGb3バンドを示しているが、pCDM8のみを導入した細胞では、Gb3バンドが全く示されないことが明かとなった（図2A）。これは、前記pVTR1中のcDNAが、

α 1,4Gal-T遺伝子に由来していることを示している。

【0064】

次に、Gb3/CD77の同定を行うため、TLC免疫染色を行った。文献(21)に記載されているように、アルミニウム塗布シリカプレート(メルク社)を用いて、TLCを行った。TLCの後、前記プレートは、文献(22)に記載されるように、PVDF膜にブロットした。この膜を、ブロッキング後、mAb38.13と共にインキュベートし、抗体の結合は、ABCキット(ベクターラボラトリーズ社、Burlingame, CA)、およびコニカイムノステイニング HRP-1000(コニカ社、東京)により検出した。このTLC免疫染色により、前記cDNA導入細胞の抽出物にのみ、Gb3の強いバンドが表われることが明かとなった(図2B)。

【0065】

<3> α 1,4Gal-T遺伝子の塩基配列解析

上記のようにしてGb3/CD77を発現すると決定されたcDNAクローンについて、PRISMダイターミネーターサイクルシーケンシングキット、およびモデル310DNAシーケンサー(アプライドバイオシステムズ社)を用いて、塩基配列を決定したところ、この2個のクローンは本質的には同一であることが判明した。したがって、これらの内の1つを、続く分析に用いることとし、pVTR1と命名した。pVTR1中のcDNAの塩基配列を、配列番号1に示す。また、この塩基配列によってコードされ得るアミノ酸配列を、配列番号1及び2に示す。

【0066】

開始コドン、コサックのコンセンサスイニシエーション配列(24, 25)に類似した配列中に含まれている。このオープン・リーディング・フレームから、分子量40,498Daの353アミノ酸タンパク質が予想される。

【0067】

これらの配列について、インターネットプログラムBLAST(National Center for Biotechnology Information)を用いてホモロジー検索を行ったが、これらの配列と高い相同性を有するcDNAまたはタンパク質は、データベース中に検索されなかった。

【0068】

さらに、ソフトウェア-GENETYX-MAC バージョン8.0 (ソフトウェアディベロプメント社) を用いて、アミノ酸配列およびハイドロパシー分析 (35) を行ったところ (図3)、26個のアミノ酸配列を有する単一の疎水性部位が、アミノ末端近傍に存在していることが判明した (アミノ酸番号20~45)。この推測上の単一のアンカー配列によって、19残基が細胞質中に、308アミノ酸残基がゴルジルーメン中に配置されると考えられる。

【0069】

また、2箇所の潜在的なN-グリコシル化部位の存在が示唆された (配列番号2のアミノ酸番号121~123、及び203~205)。さらに、比較的高い頻度 (10/31) で、プロリンが膜貫通部位のC側に認められた。

【0070】

【実施例2】 α 1,4Gal-Tの性質および製造

<1> α 1,4Gal-Tの酵素活性

実施例1で得られた α 1,4Gal-T遺伝子が導入されたL細胞から、膜画分を文献 (19) に従って調製した。得られた膜画分について、 α 1,4Gal-T活性を、文献 (4) に従って測定した。反応液の組成は、50 μ lの容量において、50mM カコジル酸ナトリウム-HCl (pH6.0)、10mM $MgCl_2$ 、5mM ガラクトノラクトン (シグマ社)、0.3% Triton X-100 (シグマ社)、0.4mM LacCer、2.9mM フォスファチジルグリセロール (シグマ社)、0.2mM UDP-Gal (シグマ社)、UDP- $[^{14}C]$ Gal (2.5 $\times 10^5$ dpm) (NEN社)、50 μ gタンパク質を含む膜画分、である。タンパク質の濃度は、ローリー法 (20) によって決定した。前記反応による生成物は、 $C_{18}SeP$ -Pakカートリッジ (ウォーターズ (Waters) 社、Milford, MA) により単離し、薄層クロマトグラフィー (TLC) およびバイオイメージアナライザー BAS2000 (富士フィルム社) を用いたオートラジオグラフにより分析した。結果を図4Aに示す。

【0071】

その結果、pVTR1/CDM8を導入したL細胞は、LacCerを受容体として用いた場合、高いGb3合成酵素活性 (7,012ユニット、pmol/h/mgタンパク質) を示した。一方、コントロールとして、pCDM8のみを導入したL細胞についても同様に測定を

行ったが、完全に陰性であった。従って、pVTR1の $\alpha 1,4\text{Gal-T}$ cDNAは、 $\alpha 1,4\text{-Gal-T}$ 活性およびGb3/CD77の表面発現を決定しており、Gb3/CD77合成酵素をコードしていることを示している。

【0072】

他の可能性のある受容体に対する酵素活性についても実験を行った（図4B）。LacCerおよびガラクトシルセラミド以外の受容体では、実質的な $[^{14}\text{C}]$ ガラクトースの取り込みは見られなかった（図4B）。これら2つの基質における K_m 値は、 $54.5\mu\text{M}$ （LacCer）および $132\mu\text{M}$ （ガラクトシルセラミド）である。P式血液型におけるP1抗原もまた、パラグロボシド（PG）に $\alpha 1,4$ ガラクトース転移することによって形成されるが、この酵素は、P1抗原の合成に関与していないことが確かめられた（図4B）。

【0073】

【実施例3】各組織における $\alpha 1,4\text{Gal-T}$ 遺伝子の発現解析

マルチプル CHOイスノーザンブロットメンブラン（オリジーンテクノロジーズ社、Rockville, MA）、および文献（18）に記載されるように $[^{32}\text{P}]$ dCTPでラベルされたpVTR1のcDNAプローブによって、文献（19）に記載されるようにノーザンブロットハイブリダイゼーションを行った。また同様に、コントロールとして、同一のメンブランおよびラベルされた β -アクチンcDNAプローブを用いて、ノーザンハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーションを行ったメンブランについて、バイオイメージアナライザーBAS2000（富士フイルム社）を用いて、その発現レベルを測定した。尚、 $\alpha 1,4\text{Gal-T}$ 遺伝子のmRNAの発現レベルは、コントロールの値で補正した後、比較することにより測定した。

【0074】

上記ノーザンブロット分析により、様々なヒト組織における $\alpha 1,4\text{Gal-T}$ 遺伝子のmRNAは、調べられた組織において、心臓、腎臓、脾臓、肝臓、精巣および胎盤において高い発現レベルを示すことが明かになった（図5）。

【0075】

【実施例4】pVTR1プラスミドの細胞への安定的導入

安定的導入細胞を調製するため、pVTR1プラスミドおよびpSV2neoプラスミドを

、リポフェクションキット (Lipofection kit) (東洋紡績株式会社) を用いて、L細胞に共導入 (co-transfection) させた。導入細胞を選別するため、細胞は、FCS (7.5%) および抗生物質G418 ($300 \mu\text{g}/\text{ml}$) を含むDMEMにて培養した。尚、G418は、neo遺伝子にコードされる3'-O-アミノグリコシドホスホトランスフェラーゼによって不活性化される。

【0076】

上記プラスミドが導入されたG418耐性細胞は、限界希釈法によりクローニングした。また、pSV2neo単独で導入されたクローンは、コントロールとして調製した。これらの細胞を、mAb38.13と共にインキュベートし、続いて、FITC結合ウサギ抗-ラットIgGと反応させ、前記と同様の方法でフローサイトメトリーをおこなった。その結果、pVTR1およびpSV2neoが安定的に導入された細胞 (L-VTR1) は、明らかにGb3/CD77を強く発現していることが示されたが、pSV2neoが単独で安定的に導入された細胞 (L-neo) では、発現が認められなかった (図6)。

【0077】

【実施例5】導入細胞のペロ毒素に対する反応

<1>MTTアッセイ

前記L-VTR1およびL-neoのペロ毒素に対する反応を比較するため、48ウェルプレート (1×10^4 細胞/ウェル) で、ペロ毒素 (VT1またはVT2) の存在下で培養した細胞を用いて、MTTアッセイを行った。このアッセイは、3連のサンプルで行った。細胞増殖を定量するため、MTT (シグマ社) $5\text{mg}/\text{ml}$ を含む $50 \mu\text{l}$ のPBSを、各ウェルに加えた。

【0078】

37℃、5時間のインキュベーションの後、上清を取り除き、0.1% NP40および4 mM HClを含む、 $100 \mu\text{l}$ のn-プロピルアルコールを加えた。発色反応は、オートマティックプレートリーダー IMMUNO-MINI NJ-2300 (日本インターメッド社、東京、日本) を用いて、620nmのリファレンスフィルターにより、590nmで定量した。

【0079】

その結果、ペロ毒素を含む培地におけるL-VTR1は、ペロ毒素非添加培地と比較

して、顕著な増殖抑制を示したが、L-neoでは、ペロ毒素の影響は見られなかった（図7）。様々な濃度のペロ毒素に晒した後のL-VTR1およびL-neoに対するMTTアッセイにより、0.01ng/mlの濃度であっても、L-VTR1は顕著な増殖抑制を示したが、L-neoでは抑制されないことが明かとなった（図8）。

【0080】

<2>DNA断片化アッセイ

ペロ毒素（VT）処理したL-VTR1の死滅に対するメカニズムを確かめるため、DNA断片化アッセイを行った。L-VTR1を、VT2（200ng/ml）の存在下で培養した。24時間後、細胞を回収し、ペレットを100 μ lのリシスバッファー（10mM Tris-HCl pH7.4、10mM EDTA、および0.5% Triton X-100）で、10分、4℃で溶解させた。遠心分離した後、上清を回収し、2 μ lのRNase（10mg/ml）および2 μ lのプロテイナーゼK（10mg/ml）を加えた。37℃、1時間のインキュベーション後、断片化されたDNAを、2-プロパノールで沈殿させた。TEAバッファー中、0.2 μ g/mlのエチジウムブロマイドを含む2%アガロースゲルで、 1.5×10^6 個の細胞から得られたDNAを用いて、電気泳動を行った。

【0081】

L-VTR1から抽出した細胞質DNAのアガロースゲル電気泳動により、アポトーシスの特徴である明確なDNA断片化のパターンを表していた（図9）。対照的に、L-neoサンプルはラダー型を示さなかった。従って、本cDNAによって生じるG b3/CD77は、ペロ毒素に対する機能的な受容体として働くことが確かめられた。

【0082】

〔参考文献〕

1. Wiegandt, H. (ed) (1985) in *Glycolipids*, pp. 199-260, Elsevier Science Publishing Co., Inc., New York
2. Paulson, J.C., and Colley, K.J. (1989) *J. Biol. Chem.* 264, 17615-17618
3. Lloyd, K.O., and Furukawa, K. (1998) *Glycoconj. J.* 15, 627-636
4. Taga, S., Mangeney, M., Tursz, T., and Wiels, J. (1995)

Int. J. Cancer 61, 261-267

5. Marcus, D.M., Kundu, S.K., and Suzuki, A. (1981) Seminars in Haematology, 18, 63-71

【 0 0 8 3 】

6. Wiels, J., Fellous, M., and Tursz, T. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 6485-6488

7. Klein, G., Manneborg-Sandlund, A., Ehlin-Henriksson, B., Godal, T., Wiels, J., and Tursz, T. (1983) Int. J. Cancer 31, 535-542

8. Balana, A., Wiels, J., Tetaud, C., Mishal, Z., Tursz, T. (1985) Int. J. Cancer 36, 453-460

9. Murray, L.J., Habeshaw, J.A., Wiels, J., and Greaves, M.F. (1985) Int. J. Cancer 36, 453-460

10. Knapp, W. et al. (Eds) (1989) in Leukocyte typing IV, p. 118, Oxford University Press

【 0 0 8 4 】

11. Mangeney, M., Richard, Y., Coulaud, D., Tursz, T., and Wiels, J. (1991) Eur. J. Immunol. 21, 1131-1140

12. Gregory, C.D., Dive, C., Henderson, S., Smith, C.A., Williams, G.T., Gordon, J., and Rickinson, A.B. (1991) Nature 349, 612-614

13. O'Brien, A.D., Lively, T.A., Chen, M.E., Rothman, S.W., and Formal, S.B. (1983) Lancet, 1, 702

14. Lingwood, C.A., Law, H., Richardson, S., Petric, M., Brunton, J.L., De Grandis, S., and Karmali, M. (1987) J. Biol. Chem. 262, 8834-8839

15. Endo, Y., Tsurugi, K., Yutsudo, T., Takeda, Y., Ogasawara, T., and Igarashi, K. (1988) Eur. J. Biochem. 171, 45-50.

【 0 0 8 5 】

16. Mangeney, M., Lingwood, C.A., Taga, S., Caillou, B., Tursz, T., and Wiels, J. (1993) *Cancer Res.* 53, 5314-5319
17. Seed B, Aruffo A (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 3365-3369
18. Nagata, Y., Yamashiro, S., Yodoi, J., Lloyd, K.O., Shiku, H., and Furukawa, K. (1992) *J. Biol. Chem.* 267, 12082-12089
19. Yamashiro, S., Haraguchi, M., Furukawa, K., Takamiya, K., Yamamoto, A., Nagata, Y., Lloyd, K.O., Shiku, H., and Furukawa, K. (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 6149-6155
20. Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. (1951) *J. Biol. Chem.* 193, 265-275

【 0 0 8 6 】

21. Furukawa, K., Clausen, H., Hakomori, S., Sakamoto, J., Look, K., Lundblad, A., Mattes, M.J., and Lloyd, K.O. (1985) *Biochemistry* 24, 7820-7826
22. Taki, T., Handa, S., and Ishikawa, D. (1994) *Anal. Biochem.* 221, 312-316
23. Miyamoto, D., Ueno, T., Takashima, S., Ohta, K., Miyawaki, T., Suzuki, T., and Suzuki, Y. (1997) *Glycoconj. J.* 14, 379-388
24. Kozak, M. (1986) *Cell* 44, 283-292
25. Kozak, M. (1989) *J. Cell Biol.* 108, 229-241

【 0 0 8 7 】

26. Wiels, J., Holmes, E.H., Cochran, N., Tursz, T., and Hakomori, S. (1984) *J. Biol. Chem.* 259, 14783-14787
27. Amado, M., Almeida, R., Carneiro, F., Levery, S.B., Holmes, E.H., Nomoto, M., Hollingsworth, M.A., Hassan, H., Schwientek, T., Nielsen, P.A., Bennett, E.P., and Clausen, H. (1998) *J. Biol. Chem.* 273, 12770-12778

28. Schwientek, T., Almeida, R., Levery, S.B., Holmes, E.H.,
Bennett E, and Clausen, H. (1998) J Biol Chem. 273, 29331-
29340.
 29. Almeida, R., Amado, M., David, L., Levery, S.B., Holmes,
E.H., Merckx, G., van Kessel, A.G., Rygaard, E., Hassan,
H., Bennett, E., and Clausen, H. (1997) J. Biol. Chem. 272,
31979-31991
 30. Lo, N.W., Shaper, J.H., Pevsner, J., and Shaper, N.L.
(1998) Glycobiology 8, 517-526
- 【 0 0 8 8 】
31. Taga, S., Carlier, K., Mishal, Z., Capoulade, C., Mangeney,
M., Lecluse, Y., Coulaud, D., Tetaud, C., Pritchard, L.L.,
Tursz, T., and Wiels, J. (1997) Blood 90, 2757-2767
 32. Mangeney, M., Rousselet, G., Taga, S., Tursz, T., and Wiels,
J. (1995) Mol. Immunol. 32, 333-339
 33. Puri, A., Hug, P., Jernigan, K., Barchi, J., Kim, H.-Y.,
Hamilton, J., Wiels, J., Murray, G.J., Brady, R.O., and
Blumenthal, R. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 14435-
14440
 34. Hammache, D., Yahi, N., Maresca, M., Pieroni, G., and
Fantini, J. (1999) J. Virol. 73, 5244-5248
 35. Kyte, J., and Doolittle, R.F. (1982) J. Mol. Biol. 157, 105-
132
 36. Svennerholm, L. (1963) J. Neurochem. 10, 613-623

【 0 0 8 9 】

【発明の効果】

本発明により、 α 1, 4 -ガラクトース転移酵素及びそれをコードするDNA
が提供される。同酵素は、Gb3/CD77等のグロボ系糖脂質の製造に利用することが
できる。

また、前記DNAは、前記酵素の製造、あるいはGb3/CD77の異常発現による疾患の治療・診断用ツール、あるいは研究手段として有用である。また、0157感染、ペロ毒素が関連する疾患の治療、診断等に利用できる可能性もある。

【0090】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> 生化学工業株式会社

古川 鋼一

<120> α 1, 4 - ガラクトース転移酵素およびそれをコードするDNA

<130> P-7040

<140>

<141> 2000-02-14

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.0

【0091】

<210> 1

<211> 1975

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (134)..(1192)

<400> 1

aaggtcggct gctgagccag ggcgtgtctc ccggaggcct gtgggctgcc aggatcccca 60
cctctctgca atgggctgcc caggctgacc agccggttcc tgctggaagc tcctggctctg 120
atctggggat acc atg tcc aag ccc ccc gac ctc ctg ctg cgg ctg ctc 169
Met Ser Lys Pro Pro Asp Leu Leu Leu Arg Leu Leu
1 5 10
cgg ggc gcc cca agg cag cgg gtc tgc acc ctg ttc atc atc ggc ttc 217
Arg Gly Ala Pro Arg Gln Arg Val Cys Thr Leu Phe Ile Ile Gly Phe
15 20 25
aag ttc acg ttt ttc gtc tcc atc atg atc tac tgg cac gtt gtg gga 265
Lys Phe Thr Phe Phe Val Ser Ile Met Ile Tyr Trp His Val Val Gly
30 35 40
gag ccc aag gag aaa ggg cag ctc tat aac ctg cca gca gag atc ccc 313
Glu Pro Lys Glu Lys Gly Gln Leu Tyr Asn Leu Pro Ala Glu Ile Pro
45 50 55 60
tgc ccc acc ttg aca ccc ccc acc cca ccc tcc cac ggc ccc act cca 361
Cys Pro Thr Leu Thr Pro Pro Thr Pro Pro Ser His Gly Pro Thr Pro
65 70 75
ggc aac atc ttc ttc ctg gag act tca gac cgg acc aac ccc aac ttc 409
Gly Asn Ile Phe Phe Leu Glu Thr Ser Asp Arg Thr Asn Pro Asn Phe
80 85 90
ctg ttc atg tgc tcg gtg gag tcg gcc gcc aga act cac ccc gaa tcc 457
Leu Phe Met Cys Ser Val Glu Ser Ala Ala Arg Thr His Pro Glu Ser
95 100 105
cac gtg ctg gtc ctg atg aaa ggg ctt ccg ggt ggc aac gcc tct ctg 505
His Val Leu Val Leu Met Lys Gly Leu Pro Gly Gly Asn Ala Ser Leu
110 115 120
ccc cgg cac ctg ggc atc tca ctt ctg agc tgc ttc ccg aat gtc cag 553
Pro Arg His Leu Gly Ile Ser Leu Leu Ser Cys Phe Pro Asn Val Gln

125	130	135	140	
atg ctc ccg ctg gac ctg cgg gag ctg ttc cgg gac aca ccc ctg gcc	601			
Met Leu Pro Leu Asp Leu Arg Glu Leu Phe Arg Asp Thr Pro Leu Ala				
	145	150	155	
gac tgg tac gcg gcc gtg cag ggg cgc tgg gag ccc tac ctg ctg ccc	649			
Asp Trp Tyr Ala Ala Val Gln Gly Arg Trp Glu Pro Tyr Leu Leu Pro				
	160	165	170	
gtg ctc tcc gac gcc tcc agg atc gca ctc atg tgg aag ttc ggc ggc	697			
Val Leu Ser Asp Ala Ser Arg Ile Ala Leu Met Trp Lys Phe Gly Gly				
	175	180	185	
atc tac ctg gac acg gac ttc att gtt ctc aag aac ctg cgg aac ctg	745			
Ile Tyr Leu Asp Thr Asp Phe Ile Val Leu Lys Asn Leu Arg Asn Leu				
	190	195	200	
acc aac gtg ctg ggc acc cag tcc cgc tac gtc ctc aac ggc gcg ttc	793			
Thr Asn Val Leu Gly Thr Gln Ser Arg Tyr Val Leu Asn Gly Ala Phe				
205	210	215	220	
ctg gcc ttc gag cgc cgg cac gag ttc atg gcg ctg tgc atg cgg gac	841			
Leu Ala Phe Glu Arg Arg His Glu Phe Met Ala Leu Cys Met Arg Asp				
	225	230	235	
ttc gtg gac cac tac aac ggc tgg atc tgg ggt cac cag ggc ccg cag	889			
Phe Val Asp His Tyr Asn Gly Trp Ile Trp Gly His Gln Gly Pro Gln				
	240	245	250	
ctg ctc acg cgg gtc ttc aag aag tgg tgt tcc atc cgc agc ctg gcc	937			
Leu Leu Thr Arg Val Phe Lys Lys Trp Cys Ser Ile Arg Ser Leu Ala				
	255	260	265	
gag agc cgc gcc tgc cgc ggc gtc acc acc ctg ccc cct gag gcc ttc	985			
Glu Ser Arg Ala Cys Arg Gly Val Thr Thr Leu Pro Pro Glu Ala Phe				
	270	275	280	
tac ccc atc ccc tgg cag gac tgg aag aag tac ttt gag gac atc aac	1033			

Tyr Pro Ile Pro Trp Gln Asp Trp Lys Lys Tyr Phe Glu Asp Ile Asn
 285 290 295 300
 ccg gag gag ctg ccg cgg ctg ctc agt gcc acc tat gct gtc cac gtg 1081
 Pro Glu Glu Leu Pro Arg Leu Leu Ser Ala Thr Tyr Ala Val His Val
 305 310 315
 tgg aac aag aag agc cag ggc acg cgg ttc gag gcc acg tcc agg gca 1129
 Trp Asn Lys Lys Ser Gln Gly Thr Arg Phe Glu Ala Thr Ser Arg Ala
 320 325 330
 ctg ctg gcc cag ctg cat gcc cgc tac tgc ccc acg acg cac gag gcc 1177
 Leu Leu Ala Gln Leu His Ala Arg Tyr Cys Pro Thr Thr His Glu Ala
 335 340 345
 atg aaa atg tac ttg tgaggggccc gccaggtcac ctccccaacc tgctcctgat 1232
 Met Lys Met Tyr Leu
 350
 ggggcactgg gccgcccttc ccgggggaggc aagattgagg gcccgggaga gggaggcccg 1292
 agctgccacc gggcttaggc aggctgttga ggagctgttg gagcaggccc agtgggaggc 1352
 tgttgacacc ccgaggacag tgtcctgtct cgaggcaggg ctgacacatg gtgccatagc 1412
 cagcggaggg cgctcagtga gtgccccggg ctttctagac aacaggcagg aaggatgaac 1472
 ctcagggcac ccccaggttg tgcggaaagc caggcagttg ggacagaggt gccacgagg 1532
 gcagaggccg gtgctaaggg gatggggaag aagggacaag attcccagag aggagaggag 1592
 gctgtttgta ggaaagtggc agggctgggg gagaccagc cccaagggtc cggggcggag 1652
 gatgctttgt tcttttctgg ttttggttcc tctttcgcgg ggggtggggg aggtcaacag 1712
 ggactgagtg gggcagaggc ccagaagtgc cagcctgggg agccgttttg gggcagcccc 1772
 ttctgcccac cccatccttc ttcctctcca gagatgccag gggggcgtgt atgctctgcc 1832
 ccttccctca gacaggggct ggggtggggag gctctttagg ctcaggagaa gcattttaaa 1892
 gaaaccccca ccctgccgcc cgcattataa acacaggaga ataataata gaataaaagt 1952
 gaccgactgt caaaaaaaaaaaa aaa 1975

<211> 353

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Ser Lys Pro Pro Asp Leu Leu Leu Arg Leu Leu Arg Gly Ala Pro

1 5 10 15

Arg Gln Arg Val Cys Thr Leu Phe Ile Ile Gly Phe Lys Phe Thr Phe

20 25 30

Phe Val Ser Ile Met Ile Tyr Trp His Val Val Gly Glu Pro Lys Glu

35 40 45

Lys Gly Gln Leu Tyr Asn Leu Pro Ala Glu Ile Pro Cys Pro Thr Leu

50 55 60

Thr Pro Pro Thr Pro Pro Ser His Gly Pro Thr Pro Gly Asn Ile Phe

65 70 75 80

Phe Leu Glu Thr Ser Asp Arg Thr Asn Pro Asn Phe Leu Phe Met Cys

85 90 95

Ser Val Glu Ser Ala Ala Arg Thr His Pro Glu Ser His Val Leu Val

100 105 110

Leu Met Lys Gly Leu Pro Gly Gly Asn Ala Ser Leu Pro Arg His Leu

115 120 125

Gly Ile Ser Leu Leu Ser Cys Phe Pro Asn Val Gln Met Leu Pro Leu

130 135 140

Asp Leu Arg Glu Leu Phe Arg Asp Thr Pro Leu Ala Asp Trp Tyr Ala

145 150 155 160

Ala Val Gln Gly Arg Trp Glu Pro Tyr Leu Leu Pro Val Leu Ser Asp

165 170 175

Ala Ser Arg Ile Ala Leu Met Trp Lys Phe Gly Gly Ile Tyr Leu Asp

180 185 190

Thr Asp Phe Ile Val Leu Lys Asn Leu Arg Asn Leu Thr Asn Val Leu
 195 200 205

Gly Thr Gln Ser Arg Tyr Val Leu Asn Gly Ala Phe Leu Ala Phe Glu
 210 215 220

Arg Arg His Glu Phe Met Ala Leu Cys Met Arg Asp Phe Val Asp His
 225 230 235 240

Tyr Asn Gly Trp Ile Trp Gly His Gln Gly Pro Gln Leu Leu Thr Arg
 245 250 255

Val Phe Lys Lys Trp Cys Ser Ile Arg Ser Leu Ala Glu Ser Arg Ala
 260 265 270

Cys Arg Gly Val Thr Thr Leu Pro Pro Glu Ala Phe Tyr Pro Ile Pro
 275 280 285

Trp Gln Asp Trp Lys Lys Tyr Phe Glu Asp Ile Asn Pro Glu Glu Leu
 290 295 300

Pro Arg Leu Leu Ser Ala Thr Tyr Ala Val His Val Trp Asn Lys Lys
 305 310 315 320

Ser Gln Gly Thr Arg Phe Glu Ala Thr Ser Arg Ala Leu Leu Ala Gln
 325 330 335

Leu His Ala Arg Tyr Cys Pro Thr Thr His Glu Ala Met Lys Met Tyr
 340 345 350

Leu

【図面の簡単な説明】

【図 1】 L細胞のGb3/CD77発現を示すフローサイトメトリーを示す図。左はpCDM8、右はpVTR1/CDM8を導入したL細胞。太線は、mAb38.13及びFITC結合ウサギ抗-ラットIgG（二次抗体）による染色の結果を、細線は、二次抗体単独による染色の結果を示す（コントロール）。

【図 2】 α 1,4Gal-T遺伝子の一過的導入細胞から抽出した糖脂質のTLCを示す図。

A : pCDM8 (VC) 又はpVTR1/CDM8 (TF) を導入したL細胞から抽出した糖脂質のT

LC。RBCは、ヒト B 赤血球細胞から抽出した中性糖脂質。

B : mAb38.13によるGb3/CD77のTLC免疫染色。

【図 3】 本発明ポリペプチドのハイドロパシーを示す図。

【図 4】 pVTR1の一過的導入細胞の抽出物における $\alpha 1,4$ Gal-T活性を示す図。

A : LacCerを受容体として用いた $\alpha 1,4$ Gal-T活性。

B : 種々の受容体に対する $\alpha 1,4$ Gal-T活性。PGは、パラグロボシド。

【図 5】 $\alpha 1,4$ Gal-T遺伝子のノーザンブロッティングの結果を示す図。A : 上段は、pVTR1に由来の 32 P-ラベル化プローブによるハイブリダイゼーションの結果を、下段は上段と同一の膜について、コントロールとして β -アクチンcDNAプローブによるハイブリダイゼーションの結果を示す。

B : 種々のヒト組織における $\alpha 1,4$ Gal-T遺伝子のmRNAの発現レベルの比較を示す図。縦軸は、コントロールにより調整した後の心臓における値に対する百分率を示す。

【図 6】 安定的導入細胞のフローサイトメトリー。左はpSV2neo、右はpVTR1及びpSV2neoを導入した細胞。細線は、mAb38.13及びFITC結合ウサギ抗ラットIgG（二次抗体）による染色の結果を、太線は二次抗体単独による染色の結果を示す（コントロール）。

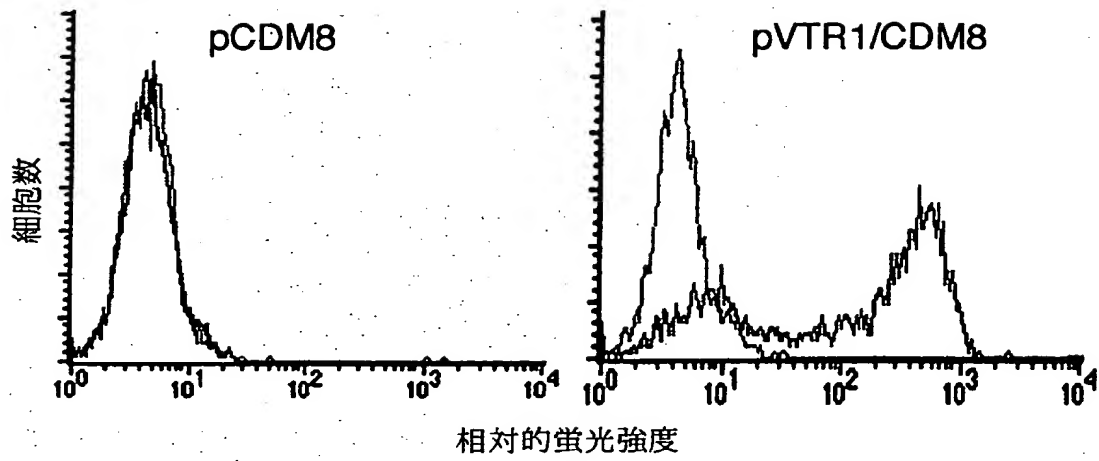
【図 7】 L-neoおよびL-VTR1のMTTアッセイの結果を示す図。左はL-neo、右はL-VTR1。

【図 8】 細胞増殖におけるペロ毒素の投与効果を示す図。

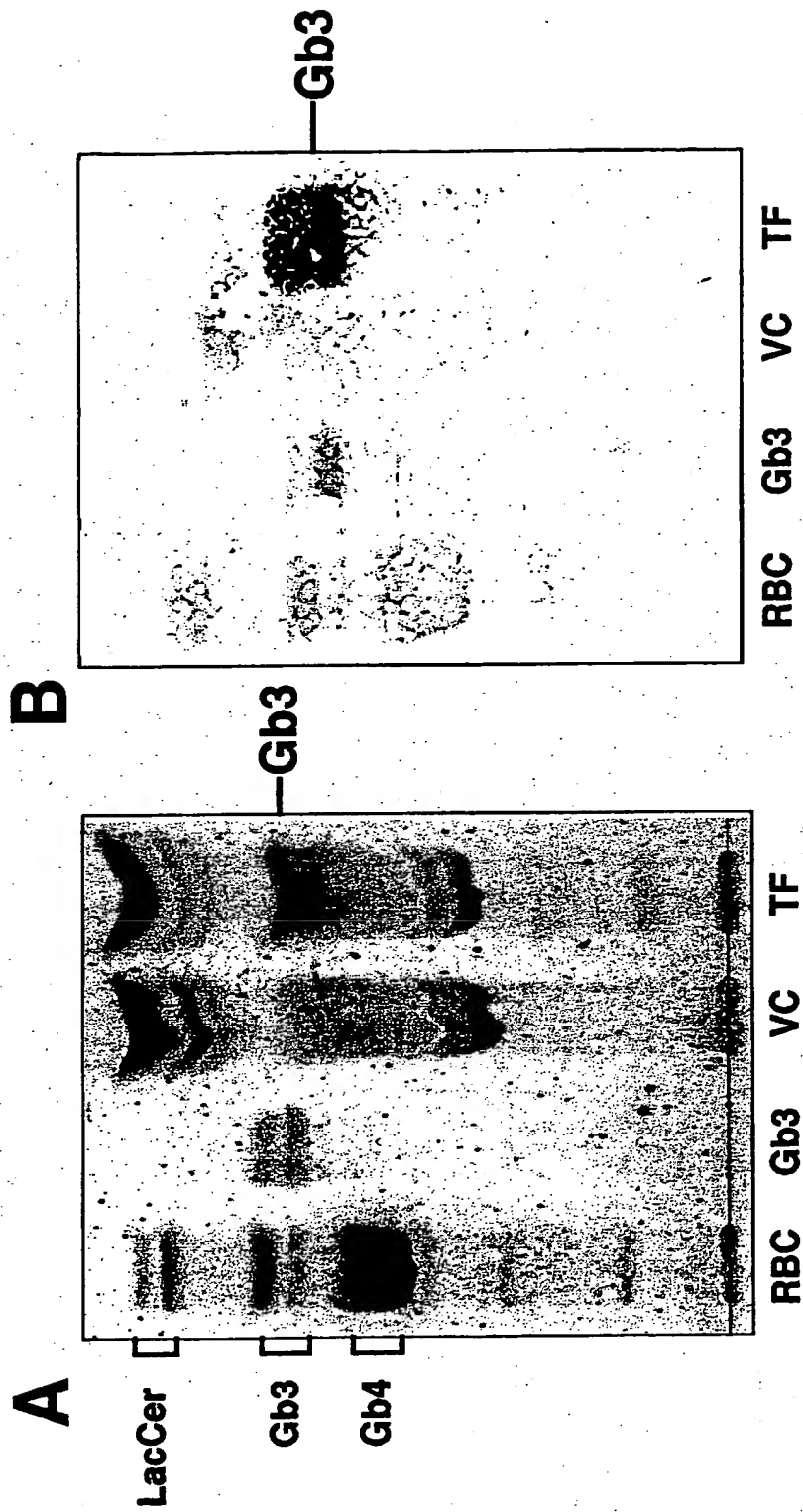
【図 9】 DNA断片化アッセイの結果を示す電気泳動図。

【書類名】 図面

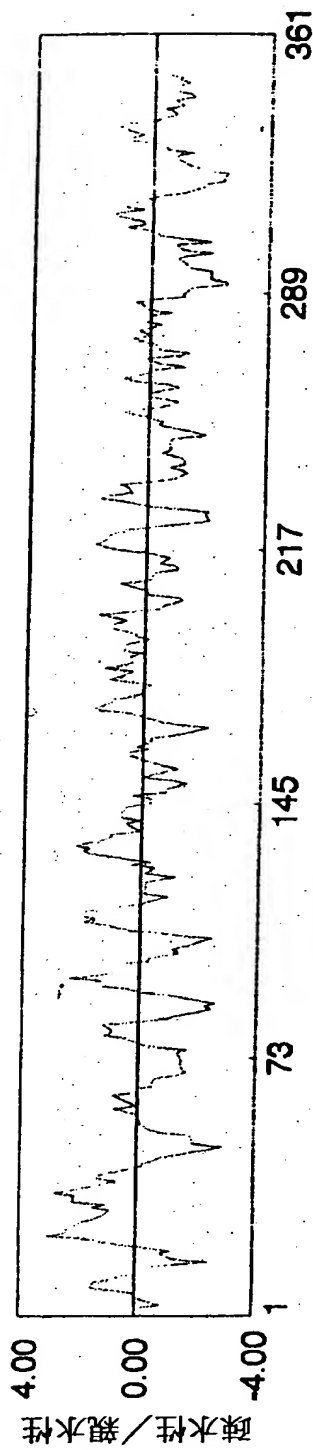
【図 1】



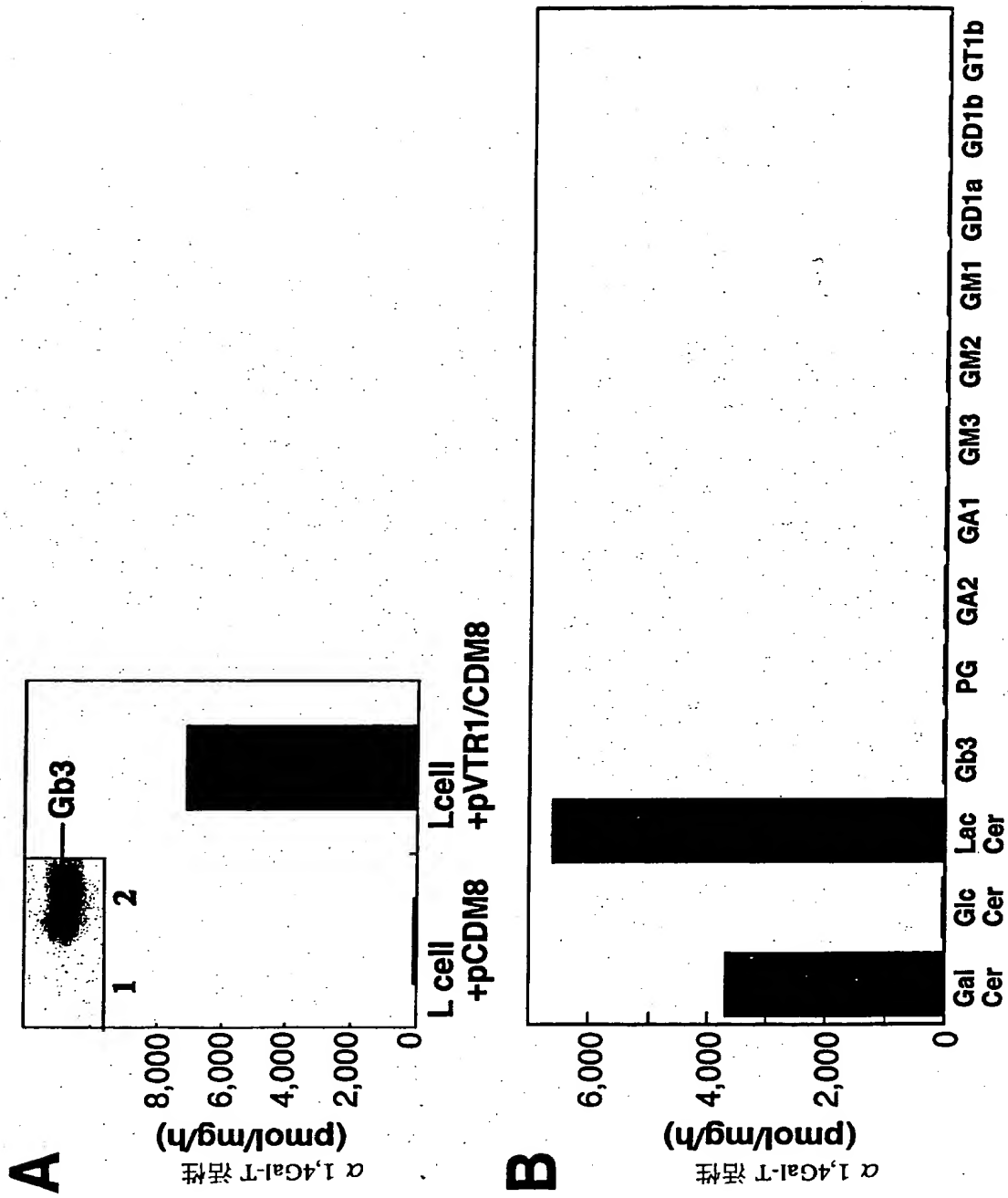
【図 2】



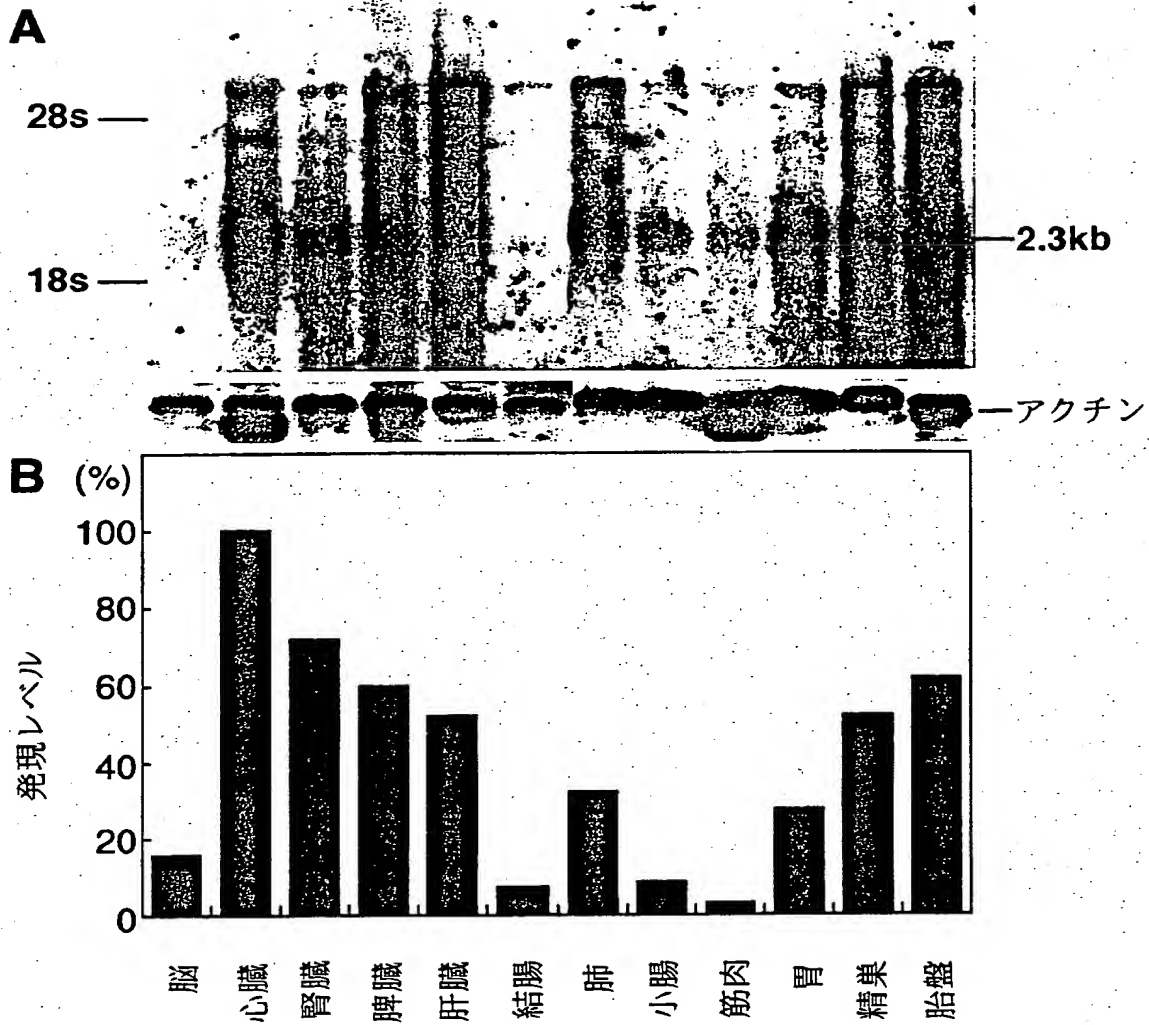
【図 3】



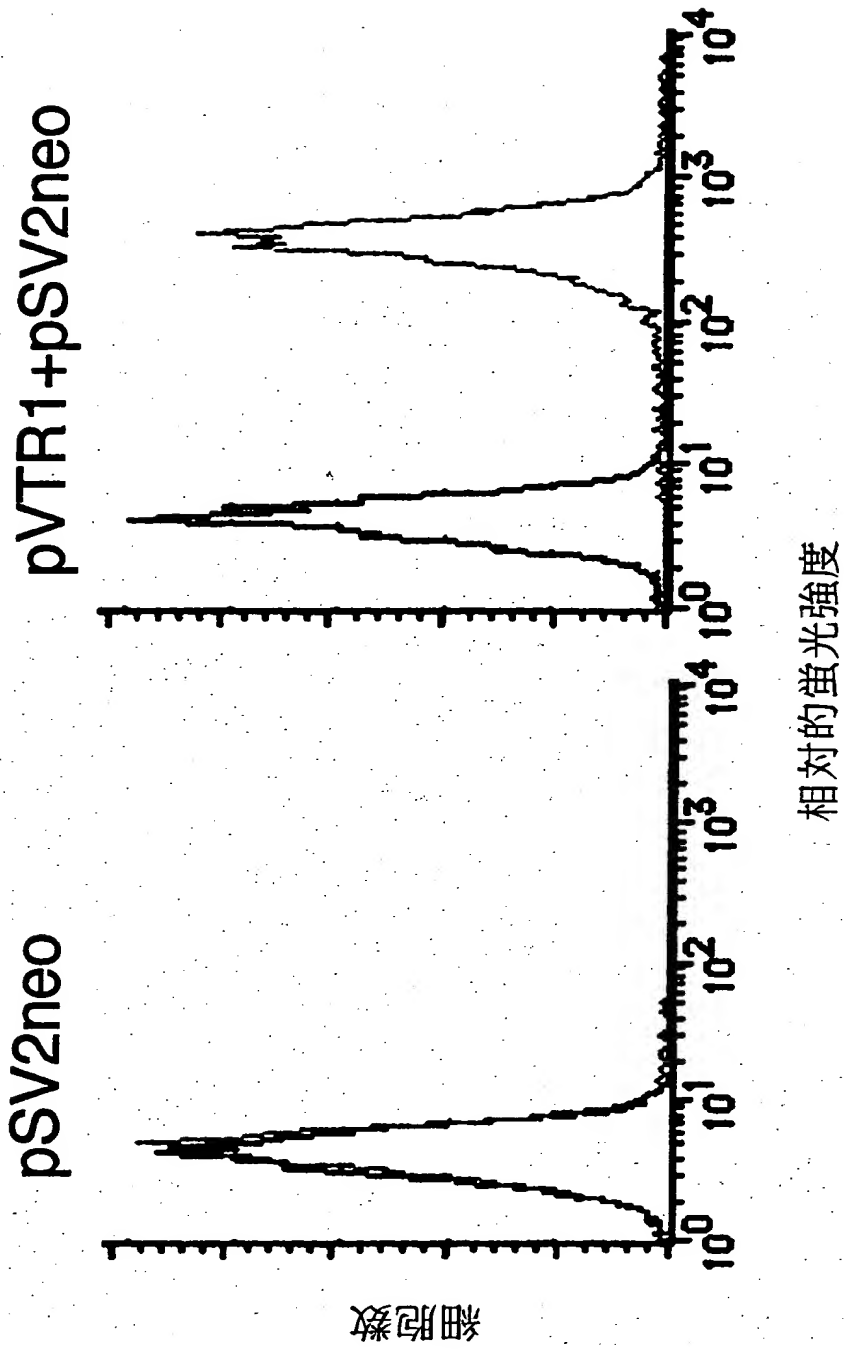
【図 4】



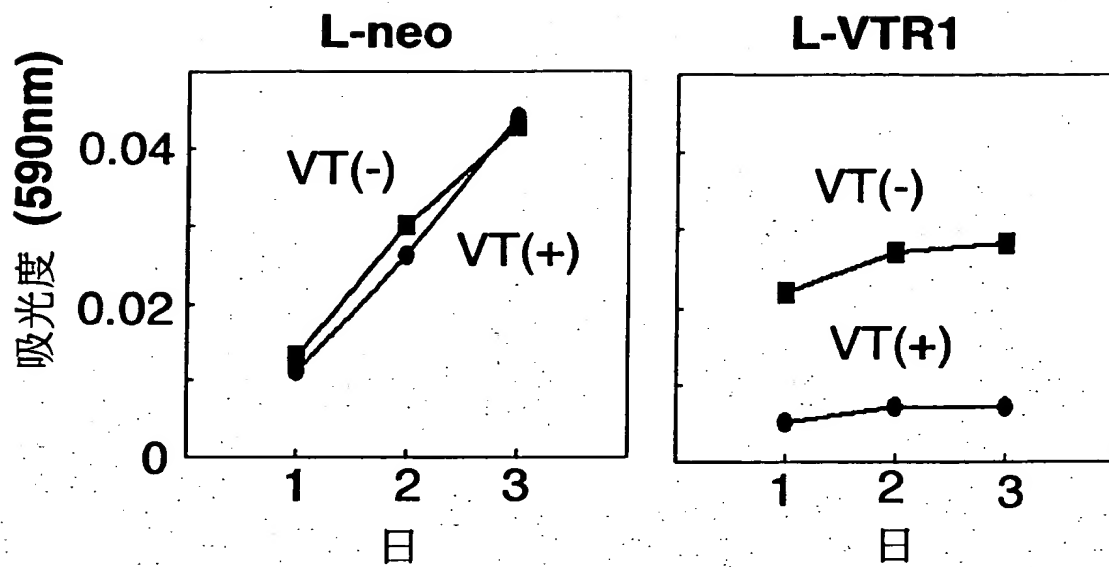
【図 5】



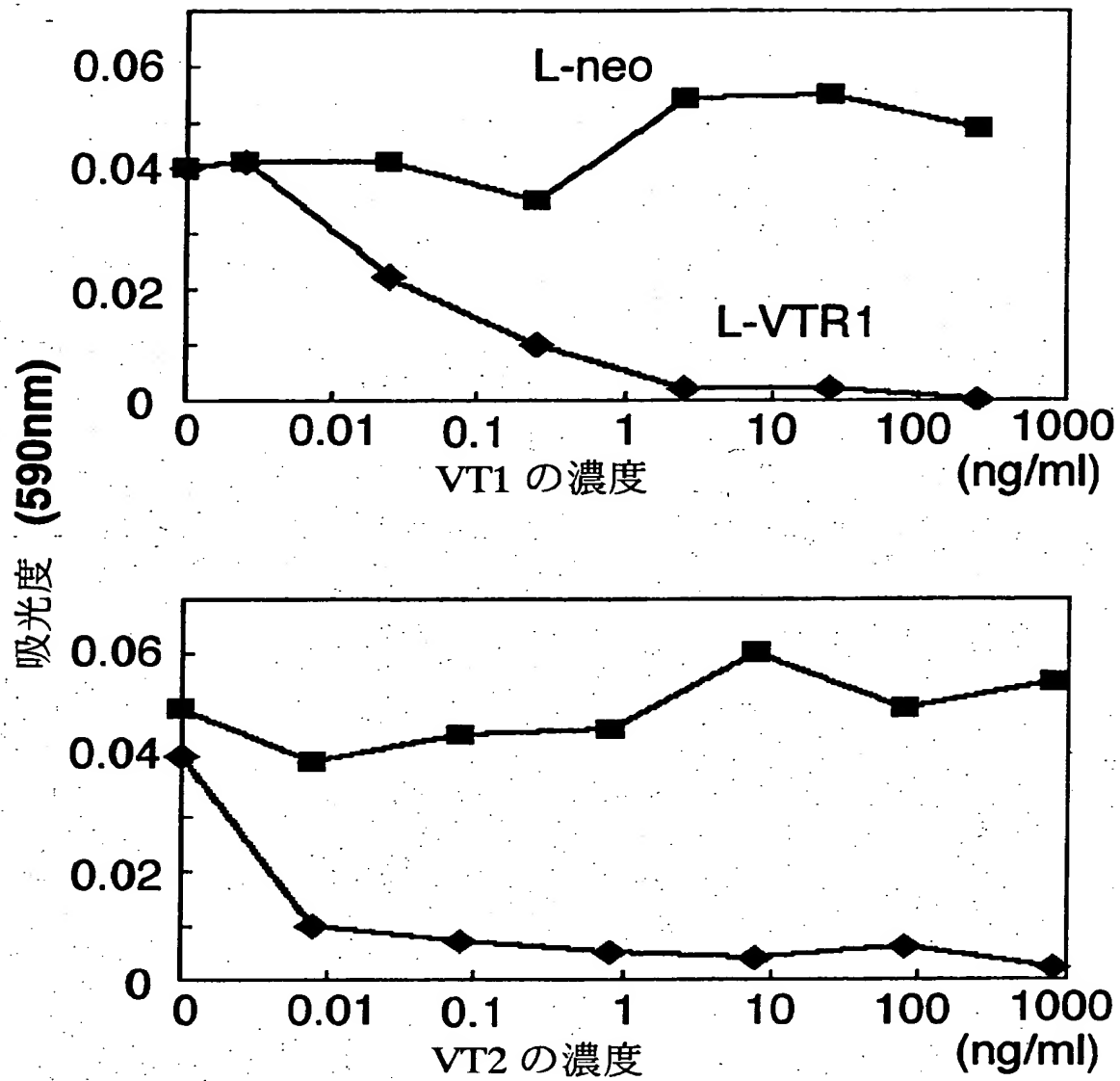
【图6】



【図 7】



【図 8】



【図 9】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 ラクトシルセラミド又はガラクトシルセラミド中のガラクトース残基の C 4 位に、ガラクトース残基を転移する α 1, 4 - ガラクトース転移酵素、及び同酵素をコードする DNA を提供する。

【解決手段】 以下の (A) 又は (B) のポリペプチド及びそれをコードする DNA。

(A) 配列番号 2 のアミノ酸番号 4 6 ~ 3 5 3 で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド。

(B) アミノ酸配列 (A) において、1 もしくは数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入または転位したアミノ酸配列からなり、かつガラクトース供与体から、受容体であるラクトシルセラミド又はガラクトシルセラミド中のガラクトース残基の C 4 位に、ガラクトース残基を転移する酵素活性を有するポリペプチド。

【選択図】 図 1

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000195524]

1. 変更年月日	1990年 8月20日
[変更理由]	新規登録
住 所	東京都中央区日本橋本町2丁目1番5号
氏 名	生化学工業株式会社

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [5 9 7 1 3 0 2 3 6]

1. 変更年月日 1 9 9 7 年 8 月 2 7 日

[変更理由] 新規登録

住 所 愛知県名古屋市北区名城 3 丁目 1 - 5 名城住宅 5 - 4 0 2

氏 名 古川 鋼一